

#2

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-38851

(24)(44)公告日 平成6年(1994)5月25日

(51)Int.Cl.  
A61L 33/00

識別記号 庁内整理番号  
A 7167-4C

FI

技術表示箇所

請求項の数3(全9頁)

(21)出願番号 特願平1-173188

(22)出願日 平成1年(1989)7月5日

(65)公開番号 特開平2-119867

(43)公開日 平成2年(1990)5月7日

(31)優先権主張番号 特願昭63-172361

(32)優先日 昭63(1988)7月11日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 999999999

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 萩原 和彦

静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内

(72)発明者 鬼頭 均

静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内

(72)発明者 横山 研司

静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内

(74)代理人 弁理士 渡辺 望稔 (外1名)

審査官 高梨 操

(56)参考文献 特開 昭59-200656 (JP, A)

特開 昭53-57287 (JP, A)

(54)【発明の名称】 医療用材料ならびに医療用器具

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】基材上にヘパリンが固定されてなる医療用材料であって、

基材表面の酸化物中に含まれる官能基と、ヘパリンのアミノ基とが、直接、または少なくとも一種のカップリング剤を介して共有結合していることを特徴とする医療用材料。

【請求項2】少なくとも血液と接触する部分が請求項1に記載の医療用材料から形成されてなる医療用器具。

【請求項3】(a)基材をオゾン処理することにより基材上に官能基を導入し、

(b)この官能基と、ヘパリンとを、直接、または少なくとも一種のカップリング剤を介して共有結合させる、ことを特徴とする医療用材料の製法。

【発明の詳細な説明】

2

<産業上の利用分野>

本発明は抗血栓性に優れた医療用材料ならびに医療用器具に関するものである。

<従来の技術>

従来より、人工肺、カテーテル、人工心臓などに利用するための抗血栓性材料はさまざまなものが考案されている。ヘパリンを基材表面に固定する方法もその一つである。その方法にはヘパリンを基材にイオンの結合する方法(特公昭54-18317号)、ヘパリンを基材に共有結合させる方法(特公昭55-46741号)がある。

<発明が解決しようとする課題>

しかしイオンの結合では血液に接触したときにヘパリンが外れたり、あるいはヘパリンの活性発現に重要である硫酸基と強固に結合しすぎるため、表面の活性が十分で

はなく、また共有結合では、AT-III（アンチトロンビンIII）との結合部の多くを基材との結合点にしており、ヘパリンの表面活性は十分ではなかった。

また、ヘパリンを固定する際にプレポリマーをコーティングする方法がとられる場合が多いが、弾性特性を要求される部位ではポリマーのはがれ、ひび割れが生じてしまう欠点を有していた。

したがって、本発明は上記問題点を解決した抗血栓性に優れた医療用材料ならびに医療用器具を提供することを目的とする。

<課題を解決するための手段>

本発明者らは従来のごとく単に基材表面に、ヘパリンを固定しようとしても十分な抗血栓性を得ることができにくい、あるいは有用部位の多くをこの固定のために用いてしまうことに鑑み、研究を重ねた結果、有用部位の殆どは残したまま固定を行い、また弾性体にもヘパリンを安定的に固定を行なうことに成功し本発明に至った。

本発明の医療用材料は、基材においては、オゾン処理によって基材上に直接または1つあるいは複数のカップリング剤を介してヘパリンを結合しうる官能基を導入する。この官能基はアミノ基、アルデヒド基あるいはエポキシ基であるのがよい。

このような基材およびヘパリンを用意して、基材表面にヘパリンを固定させる。基材上に導入された上記官能基とヘパリンとの固定は、直接、または1種類あるいは複数種のカップリング剤を介して共有結合により行う。1種類のカップリング剤を用いる場合は、カップリング剤として2つ以上のアルデヒド基や、エポキシ基を有する化合物を用いることができる。

また、複数種のカップリング剤を用いる場合は、基材上に導入された上記官能基にアミノ基等の官能基を2つ以上有する化合物からなるカップリング剤を予め結合させて基材をアミノ基等を導入した後、ヘパリンを2つ以上のアルデヒド基やエポキシ基を有する化合物からなるカップリング剤を用いて基材に結合させることが好ましく、更にはヘパリンを結合する際に、カップリング剤をヘパリンと同時に、あるいはヘパリン投入以降に反応系内に投入することが好ましい。

このようにすると、ヘパリンが基材近傍に高密度で存在している状態でカップリング剤を反応させるのでカップリング剤を有効に作用させることができ、ヘパリンがより多く基材上に固定される。

特に、前者のカップリング剤においてアミノ基を導入するようなカップリング剤を用いたときは、ヘパリンのアミノ基と反応系内ではほぼ同様な反応性を示すので、より効率的に後者のカップリング剤によるヘパリンの基材への固定を行わせることができる。

また、ヘパリンと直接結合するカップリング剤の官能基または基材に導入された官能基がアルデヒド基である場合は、ヘパリンとして、ヘパリンのN-硫酸基の一部を

脱硫酸して第1級アミノ化したものを用いることが好ましい。

以上のような製法で得られる医療用材料は種々の抗血栓性材料として利用でき、この抗血栓性材料は特に血液を接触する部分を有する医療用器具に用いることができる。医療用材料としては中空糸、チューブなどを挙げることができ、医療用器具としては人工肺、人工心肺回路、カテーテル、人工心臓などを挙げることができる。また、中空糸、人工肺のガス交換膜はともに多数の細孔を有する多孔質膜を用いるのがよく、予め細孔には細孔より小径のシリカのような微粒子を充填したものがよい。

以下に本発明について詳細に説明する。

本発明の医療用材料は、エポキシ基、アルデヒド基のような官能基を有する基材に、ヘパリンを直接または1つあるいは複数のカップリング剤を介して固定したものである。また、ヘパリンは、カップリング剤を用いた場合は、カップリング剤の官能基がアルデヒド基である場合は、反応性の点からN-硫酸基の一部を脱硫酸化して第1級アミノ化したヘパリンを用いることが好ましい。

まず上記官能基を有する基材について説明する。

基材としては、用途に応じて使い分けられることもあるが、ポリプロピレン、ポリウレタン、ポリ塩化ビニルなどが一般に使用される。

この基材自体は一般にヘパリンと直接、あるいはカップリング剤を介して結合しうる官能基を有していない場合が多い。このような場合には基材に上記官能基を導入する。導入方法には種々あるが、以下に述べるような方法によるのが好ましい。

本発明においては、上記官能基を導入するために、オゾン酸化を利用する。一般に有機化合物をオゾン酸化するとさまざまな官能基、例えば、アルデヒド、ケトン、エポキシなど反応性の高い官能基が生成される。

そこで基材をオゾン処理し、表面に導入されたこれらの反応性の高い官能基を使用し、ヘパリンを固定化することを考案した。これらの官能基に直接官能基を結合させることも可能ではあるが、立体障害等の問題もあり、これらの官能基にスペーサー（カップリング剤）を導入し、ヘパリンを結合する方法が、容易で、しかも表面のヘパリン活性発現の点からも有用である。

次に、オゾン処理法について説明する。

オゾン処理は、 $O_3$ をオゾン発生機で酸化させた $O_3$ ／ $O_2$ ガスを基材と接触させればよい。また、オゾンを溶媒に溶解させて用いてもよいが、用いる溶媒はオゾンにより酸化されるのを防止するため、水、酢酸、トリクロロフルオロエタン、四塩化炭素等がよい。

またオゾンの処理条件は、濃度、反応時間、反応温度等、その材質により千差万別である。

たとえばある材質には至適条件でも、他の材質には十分官能基が導入できなかったり反応が強すぎて材質が劣化

しすぎたりする。一つの目安として気体状態で接触させる時は、1~20mg/lの濃度、50~1000ml/minの流量、0~70℃の反応温度で0.5~120minの反応時間のうちからその材質に合った至適条件を選択することが可能である。

これらの手法により、ポリウレタン、ポリアミド/ポリエーテルのコポリマーなどの弾性体に直接官能基を導入することができるため、ポリマー表面の剝離等もなく、容易にヘパリンを結合することができる。

次に、上述した官能基を有する基材を固定するためのヘパリンについて述べる。

ヘパリンは抗血栓性を示す化合物として広く知られ、 $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{Na}$ というN-硫酸部位を有している。ヘパリンをそのまま基材表面に固定することもできるが、ヘパリンと結合する相手の官能基がアルデヒド基のように元来ヘパリンが持つアミノ基だけでは十分に固定しきれない官能基である場合は特に、ヘパリンのN-硫酸部位の一部の脱硫酸化を行って第1級アミノ化しておく。

この場合、第1級アミノ化の程度は、ヘパリン中の全アミノ基の内、第1級アミノ基の量が5~25%にするのがよい。より好ましくは10~20%、更に好ましくは10~15%がよい。ここで、ヘパリン中の第1級アミノ基の量とは、N-硫酸部位を脱硫酸化して第1級アミノ化したもの、およびヘパリン自体が持っていたものの両方を含む。ヘパリン中の第1級アミノ基の量が5%未満では基材に固定されにくくなり、25%を超えるとヘパリンの活性が低下してくるので、5~25%にしておくのがよい。

ヘパリンのN-硫酸部位の脱硫酸化は次のようにして行うことができる。その具体例を挙げて説明する。

市販のヘパリンを蒸留水に溶かし、10%ヘパリン溶液を作製した。このヘパリン溶液10mlに5.5N硫酸0.4mlを加え、95℃にて反応させ、経時的にサンプリングし、そのアミノ基量の増加をニンヒドリン法(注1)、ヘパリン活性を合成基質法で測定した。結果を第1図に示す。

また文献上、ヘパリン中の全スルホアミノ基を脱硫酸化するとされる条件(2%ヘパリン、0.04N塩酸、95℃)にて反応を行ない、経時的なアミノ基量の増加を同様に測定した。

結果を第2図に示す。

(注1)

ニンヒドリン試薬：ニンヒドリン2g、ヒドリンダンチン0.3gをメチルセロソルブ75mlに溶かし、4N酢酸ナトリウム(pH5.5)を25ml加える。

検体0.75mlにニンヒドリン試薬0.5mlを加え、沸騰水中で15分間加熱する。急冷した後25%エタノール5mlを加え、570nmで吸光度を測定する。アミノ基の定量はロイシンの発色度として数値化する。

第1図において、○印は血液の凝固第2因子に対する抗凝固性を示すもので、●印は血液の凝固第10因子に対する抗凝固性を示すものである。ヘパリンが高分子量域でなければその抗凝固性を発現しない凝固因子と、低分子量域でもその抗凝固性を発現する凝固因子とがある。そこで、第1図ではそれぞれの凝固因子の代表する第2と第10因子を例にとってヘパリンの高低両分子量域に対する抗凝固活性はほぼ同じであることを示した。

第1図および第2図からわかるように、インキュベーション時間とともにヘパリン中の第1級アミノ基は増加するが、第1図からわかるように、ヘパリン活性は徐々に低下する。したがってヘパリン活性が不適当に低下しないような領域でヘパリンのN-硫酸部位の第1級アミノ化を行う必要がある。

具体的にはヘパリンのロイシン当量が0.05~0.18( $\mu\text{mol}/10\text{mg}$ )であることが好ましく、更には0.05~0.13( $\mu\text{mol}/10\text{mg}$ )あることが好ましい。即ち、ロイシン当量が0.05( $\mu\text{mol}/10\text{mg}$ )より低いと、第1級アミノ基が十分でなく、基材表面へのヘパリンの固定量が低下してしまい、0.18( $\mu\text{mol}/10\text{mg}$ )より高いと、ヘパリン活性が低下してしまうので好ましくない。

次に、前述のようにして得た官能基を有する基材と、ヘパリンとの固定について述べる。

基材とヘパリンとの上記固定はカップリング剤の少なくとも1つ好ましくは2つ以上のアルデヒド基やエポキシ基等を有する化合物を用い、アミノ基とこれらの官能基の反応により結合することができる。このようなアルデヒド化合物としては、グルタルアルデヒドなどを挙げることができる。カップリング剤としては、アルデヒド化合物の他にエポキシ化合物であるポリエチレングリコールジグリシジルエーテルなどを用いてもよい。これらの場合、基材上のオゾン処理により得た官能基に、2つ以上の第1級アミノ基を有するカップリング剤(例えば、ポリエチレングリコールジアミン、ポリエチレンイミン)をあらかじめカップリングすることが好ましく、以下にその説明をする。

まず、基材上の導入された官能基に2つ以上の第1級アミノ基を有するカップリング剤を、基材が成形されたものであれば、カップリング剤溶液を塗布、またはその溶液中に基材を浸漬し、基材が液状であれば、カップリング剤を混合することによって結合させ、基材にアミノ基を導入する。例えば、水、低級アルコール、クロロホルム、アセトン等の反応液中で基材と2つ以上の第1級アミノ基を有するカップリング剤とを接触させることにより行なわれ、その際の条件は、水系溶媒の場合、pH4~12、温度0~80℃、反応時間は10分~24時間とするのが好ましい。即ち、pHが4未満であるとカップリング剤の基材表面への結合性が低下し、また材質によっては基材の劣化のおそれがあり、12より大きいと、基

材の材質によっては劣化のおそれがあるので好ましくない。温度が0℃未満であると、反応性が低下してしまい、80℃より高いと、第1級アミノ基が変性するおそれがあるので好ましくない。

また、反応時間は10分未満であると反応が十分に進行せず、24時間より長いとpHが極端に低かったり高かったりする場合や、温度が極端に高かったりする場合に基材等に悪影響を及ぼしたり、アミノ基の変性のおそれがあるので好ましくない。

アミノ基を2以上有するカップリング剤としては、ポリエチレンジアミン(PEI)、ポリエチレングリコールジ

アミン、エチレンジアミン、テトラメチレンジアミン等が挙げられる。

また、本発明に用いられる基材としては、末端に前記アミノ基と結合可能な反応性基を有するものであればよく、カルボキシメチルセルロース、グリシジルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体などがある。また、ポリ塩化ビニルをはじめ塩化ビニル-酢酸ビニル共重合体、塩化ビニル-エチレン共重合体、塩化ビニル-塩化ビニリデン共重合体、ポリ塩化ビニル-ウレタン共重合体、ポリ塩化ビニル-アクリロニトリル共重合体、塩化ビニル-メタクリル酸メチル共重合体、および上記ポリマーと可塑剤とからなる軟質ポリ塩化ビニル変性体、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリスチレン、アクリロニトリル-ブタジエンスチレン(ABS)、アクリロニトリル-スチレン樹脂、ポリメタクリル酸メチルなどについてはこれらをオゾン酸化や、部分加水分解等の処理を行なうことにより、容易にアミノ基と反応する官能基に変換させることで用いることができる。

このようにして基材にアミノ基を導入した後、このアミノ基とヘパリンのアミノ基とを2つ以上のアルデヒド基やエポキシ基を有するカップリング剤により結合し、基材にヘパリンを固定する。2つ以上のエポキシ基を有するカップリング剤を例にとって説明する。このカップリング剤としては、2つ以上のエポキシ基を有する化合物であればいかなるものでもよいが、反応に有利な点で水溶性の化合物であることが好ましい。具体的には、デナコール®EX-421、512、521、611、612、614、614B、あるいはジエポキシ化合物として、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、デナコール®EX-313、810、811、851、821、830、832、841、861(ナガセ化成社製)等が挙げられる。さらにエポキシの反応性のちがから、デナコールEX-313、421、512、521、810、811、821、851等がさらに好ましい。

さらに前述の方法によって共有結合した基材上のアミノ基とヘパリンのアミノ基とが、エポキシ基を2以上有する化合物のエポキシ基と、それぞれ結合するその反応方法は、アミノ基が導入された基材と、上記カップリング

剤と、ヘパリンとを同時に混合し反応させてもよいし、はじめに基材のアミノ基とヘパリンの官能基とを反応させ、軽く結合させた後、カップリング剤のエポキシ基と反応させてもよい。

例えば、同時に混合し反応させる際には、反応条件として、pH2.0~10.0、反応時間1hr~200hr、反応温度15~80℃とするのがよい。

pHがこの範囲にあるとヘパリンの安定性が好ましい。反応時間は1hr未満では反応が十分でなく、200hr超ではヘパリンの分解、過度の架橋による表面に固定されたヘパリンの表面活性低下のため好ましくない。

反応温度は15℃未満では反応が十分に進まず、80℃超ではヘパリンの安定性が低下するため好ましくない。また溶媒は、例えば、水等を用いることができる。

また、はじめに基材のアミノ基と、ヘパリンの官能基とを反応させて、これらをイオン結合させておき、その後エポキシ基を有する化合物と架橋反応させる場合は、はじめの基材とヘパリンとの反応条件として、pH2.0~5.0とするのがよい。

pH2.0未満ではヘパリンの安定性が低下し、pH5.0超では基材表面の陽荷電が低下し、結合ヘパリン量が低下するため好ましくない。

反応温度は、0~80℃とするのがよい。0℃未満ではイオン結合速度が著しく低下し、80℃超ではヘパリンの安定性が低下するため好ましくない。

また反応時間は、10~1500分とするのがよい。10分未満ではイオン結合が不十分であり、1500分超ではイオン結合量が完全に飽和してしまい、新たに結合することはないため無駄である。

反応方法としては、基材にヘパリン溶液を浸漬させてもよいし、塗布してもよい。

また、基材が液体の場合は、ヘパリン溶液と混合すればよい。

さらに前記基材とヘパリンとの反応生成物とエポキシ基を有する化合物とを架橋反応させる際、pHはアルカリ下でも酸性下でもよい。しかし、本発明において、酸性下でなければアミノ基をもった表面が、 $\oplus$ にチャージしないため、ヘパリンが表面からすみやかに離脱するため酸性でないと効果的な架橋はできず、好ましくない。

化合物の濃度は効率的な架橋のため、エポキシ基の含量で0.01~2mol/lとするのがよい。

また、反応温度としては、15~80℃とするのがよい。15℃未満では反応が十分でなく、80℃超ではヘパリンの安定性が低下するため好ましくない。

反応時間は1hr~200hrとするのがよい。1hr未満では反応が十分でなく、200hr超ではヘパリンの分解、過度の架橋による固定ヘパリンの表面活性の低下のため好ましくない。

また反応方法としては、前記基材とヘパリンとの反応生成物が成形済の場合は、化合物中に浸漬させてもよい

し、塗布してもよい。

また、成形前の液体の場合は、化合物の溶液と混合すればよい。

この反応によって得られる生成物は、

①基材のアミノ基と化合物のエポキシ基とが反応し、網目構造になっている中に、ヘパリンが閉じ込められている。

②基材のアミノ基とヘパリン中のアミノ基がエポキシ基と架橋されている場合の2つの固定状態が考えられる。しかし、ヘパリンの溶出実験の結果、ヘパリンの溶出は初期から全く認められないことにより、ほとんどが②によるものと思われる。

架橋にアルデヒドではなく、エポキシ化合物を用いることで、還元剤等を用いた工程複雑な後処理は必要ではなく、エタノールアミン等を接触させるだけの、より簡便な処理で行なうことができる。

また、アルカリ下でエタノールアミン等を用いることで、イオン結合性のヘパリンを除去することができるため、使用時でのイオン結合性のヘパリンの大量脱離による出血傾向を防止する点において優れたものとなる。また親水性のエポキシ化合物を用いれば、水系で処理を行なうことができ、かつ表面の血液とのなじみもよくなることから、より大きな表面活性を発現することが可能となる。

またヘパリンをあらかじめスルフォアミノ基の脱硫酸化をする必要がないため、工程が簡略化できるだけでなく、反応条件の微妙なちがいによるバッチ間のヘパリン力価の変動、力価の低下を生じることなく高力価のヘパリンを安定して固定することができる。

また医療用器具は、前記抗血栓性材料に例示したと同様の樹脂を用いて、成形したものを基材として用い、後ヘパリンおよびカップリング剤と反応させてもよいし、抗血栓性材料をシート状に加工したものを医療用器具の成形品表面に貼付けてもよい。

また、基材とヘパリンとは直接結合することもできる。このとき、官能基としてはアミノ基と結合しうるエポキシ基、アルデヒド基が共通結合点となる。

このように、上記官能基を有する基材にヘパリンを固定した医療用材料は、ヘパリンの抗血栓性を利用した抗血栓性材料であり、これは種々の医療器具、例えば、人工肺、人工心臓回路、カテーテル、人工心臓などに少なくとも血液と接触する部分に用いることができる。特に人工心臓回路、体内留置カテーテルに用いれば、抗血栓性に優れ、しかも折れ、曲げ、クランプにも安定な人工心臓回路、体内留置カテーテルが得られる。また、ガス交換膜として多数の細孔を有する多孔質膜（たとえば中空糸）を上記のごとく処理すれば、抗血栓性を有する中空糸が得られ、上記多孔質膜（たとえば中空糸）を人工肺に用いれば、抗血栓性のすぐれた人工肺が得られる。

また、人工肺に用いる多孔質膜の細孔中には予め細孔よ

り小径の微粒子を充填しておくのがよい。その理由は、ガス交換膜が多孔質で疎水性でしかもオゾン処理により官能基が出現しない場合、官能基が出現するようなポリマーをあらかじめコーティングしなければならないが、その場合ガス交換膜に均一にポリマーをコーティングすることができず、このため抗血栓性が十分に発揮できない、またヘパリンの固定により膜が親水化するため、長時間循環時に細孔からの血漿の漏れが生じてくることがあるのを防ぐためである。

10 多孔質膜への微粒子の充填については特開昭62-64374号に記載されているようにするとよい。ここでは簡潔に述べる。

多孔質膜にこの細孔よりも小径の微粒子の分散液をちょうど細孔内に微粒子が目詰りするように流す。

該微粒子の材質としては、シリカ、アルミナ、ジルコニア、マグネシア、硫酸バリウム、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、酸化チタン、シリコンカーバイト、カーボンブラック、ホワイカーボン等の無機物質、あるいは、ポリスチレンラテックス、スチレンゴム（SBR）ラテックス、ニトリルゴム（NBR）ラテックス等の高分子ラテックスなどが用いられ得るが、特にシリカが望ましい。また、該微粒子の平均直径は0.003~1.0μm、好ましくは0.003~0.5μm程度のものである。

該微粒子は、分散液とされて、該ガス交換膜にかけられる。分散媒としては、該微粒子および該ガス交換膜に対して安定なものであればいずれを用いても良いが、たとえば水、アルコール類等が用いられる。しかしながら分散媒が水である場合には、該ガス交換膜が疎水性の場合は、分散液を流す前にエタノール、イソプロパノール等のアルコール類を該ガス交換膜の表面に接触させてガス交換膜の表面を親水化させておくことが必要である。ガス交換膜が中空糸の場合には、中空糸の内部から適当に加圧した微粒子分散液を通過させると、微粒子の充填が好適になされる。

#### <実施例>

以下に本発明を実施例を挙げて具体的に説明する。

A. カップリング剤として2以上のアルデヒド基を有する化合物を用いた場合

1. 基材への官能基の導入

40 (実施例1)

ナイロンとポリエーテルのブロックコポリマーであるPEBAX6333SAOO、同2533SAOO（Atchem社）および溶媒可溶性ポリウレタン（NKY-9LH/日本ポリウレタン）（以下各々A、B、Cとする）のシートを作製した。これらのシートを、オゾン発生機（日本オゾン（株））にて、0.8l/min O<sub>2</sub>、50℃の条件で、Aは10分、B、Cは20分処理した（以下各々A1、B1、C1とする）。

ESCAにより、オゾン処理前後での表面元素組成比の50 変化を測定した。その結果を表1に示す。

またシッフ試薬により、表面のアルデヒドの確認を行った。その結果、オゾン処理をしたもの(A1、B1、C1)は赤紫から青紫色に染色されたが、オゾン処理をしていないもの(A、B、C)は染色されなかった。

表1 ESCAによる表面組成分析

	A	A1	B	B1	C	C1
O	17.12	29.16	21.25	25.85	18.39	22.43
N	0.80	1.43	1.70	4.78	3.36	4.17
C	82.05	69.74	77.04	69.36	78.25	73.40

## II一部脱硫酸化ヘパリンの作製

### (実施例2)

市販のヘパリンを蒸留水に溶かし、10%ヘパリン溶液を作製した。このヘパリン溶液10mlを5.5N硫酸0.4ml中に入れ、97℃で10分間インキュベートした。

得られたヘパリン中の全アミノ基内の第1級アミノ基は、ヘパリンが最初から有するものおよびN-硫酸部位が脱硫酸化されて第1級アミノ化されたものを含めて11%であった。

## III基材へのヘパリンの固定および評価

### (実施例3)

実施例1にしたがって作製したシート(A、B、C、A1、B1、C1)をpH10に調整した1.7%PGD-10(ポリエチレングリコールジアミン)または0.5%ポリエチレンジアミン(PEI)(BASF社)に45℃、24時間浸漬した。続いて実施例2により反応させた一部脱硫酸化ヘパリンおよび反応前のヘパリンについて0.5%、pH4.5酢酸緩衝溶液を作製し、この膜をこの溶液中に45℃、24時間浸漬した。続いて2.5%グルタルアルデヒドpH4.5酢酸緩衝溶液中に、室温で24時間浸漬した。続いて1%NaBH<sub>4</sub>、pH10炭酸緩衝溶液中に、室温、4時間浸漬した。

これらの処理をしたシートを0.01N塩酸に浸漬した後、トルイジンブルーにより染色した結果、オゾン処理をしないシート(A、B、C)は、いずれもほとんど染色されなかった。

また、オゾン処理したもの(A1、B1、C1)では、反応前のヘパリンを反応させたものについてはわずかに染色されたのみであったが一部脱硫酸化したヘパリンを反応させたものはA1、B1、C1とも紫～赤紫色に染色された。

また、実施例1にしたがって作製したシート(A、B、C、A1、B1、C1)をPEI、PGD-10を反応させる工程を除いて同様に処理したものについて確認したところ、オゾン処理した後、一部脱硫酸化されたヘパリンを反応させたもののみ青紫色に染色された。

### (実施例4)ヘパリン固定化チューブの抗血栓性

実施例1に示したポリマーBにて、内径1.4mmのチュ

ーブを作製した。また、ポリウレタンの内面にポリマーCをコーティングした内径1.4mmのチューブを作製した。ついで実施例1と同様のオゾン処理条件にてこれらのチューブの内側をオゾン処理した後、実施例2で得た一部脱硫酸化ヘパリンを実施例3のようにして固定化した(以下各々B2、C2、B3、C3とする)。また上記チューブをオゾン処理せずに同様にヘパリン固定処理したものも作製した(以下各々B4、C4、B5、C5とする)。

ここで、B2、C2、B4、C4はポリエチレングリコールジアミンを、B3、C3、B5、C5はポリエチレンジアミンを基材とヘパリンのカップリング剤として用いたものである。

これらのチューブについて、pH9のホウ酸緩衝溶液で15時間洗浄し、さらにpH7.4のリン酸緩衝溶液で2時間洗浄した後、各チューブの表面抗トロンビン活性を測定した。具体的な方法は、ヘパリン固定チューブを56cmにて切断し、トロンビン0~10U/cc(4%Alb生食溶液)を0.5ml注入し、15minロータリーミキサーで内面と接触させる。その後、内液のトロンビン濃度を測定し、内面吸着トロンビン量を算出する。トロンビン吸着チューブは生食で洗浄後、0.6mn S-2238 1.0mlを2ml/minでチューブ内を流し、チューブから出てきた液は50%酢酸0.2ml中に滴下し、反応を止める。その反応液の吸光度を測定し、内面吸着トロンビン量に対するS-2238の発色性の検量線を作成する。

次にトロンビンを吸着させたチューブにATIII 1U/ccを入れ、インキュベーションした後、同様にS-2238を内面残存トロンビンで発色させ、その発色度と検量線より内面残存トロンビンを算出する。

ATIIIのインキュベーション時間を変化させた時の内面残存トロンビン量の変化が第3図である。その結果を第3図に示す。以上よりオゾン処理したものは活性があった。

また、同チューブをさらに30分血漿で洗浄し、血漿中に洗い出されるヘパリンを洗浄した後、チャンドラーズループテストを行なった。

その結果を表2に示す。これからオゾン処理をしたものでヘパリン固定の効果が実際の血液中で表われていることがわかる。

チャンドラーズループテストの方法および意義は以下の通りである。

抗凝固されていない新鮮血が凝固するまでの時間を測定することによりその新鮮血がふれている材質の抗血栓性のレベルを評価できる。

同チューブを20cmに切断し、その中に家兎耳静脈より採血した新鮮血88μlを入れ、輪にして8r.p.m.で回転させる。

そして血液が凝固してチューブと一緒に回り出すまでの

時間を測定する。

\* 定され、抗血栓性が付与されることがわかる。

以上の結果よりオゾン処理をする事によりヘパリンが固\*

表2 チェンドラーズルーブテスト(全血凝固時間)

	B2	B3	C2	C3	B4	B5	C4	C5
RUN1	40' 15"	60' <	-	-	10' 20"	12' 40"	-	-
RUN2			27' 25"	60' <			11' 55"	12' 20"
RUN3	60' <	60' <			12' 10"	13' 45"		
RUN4			26' 30"	30' 35"			11' 20"	10' 05"
RUN5	52' 50"	60' <	31' 40"	60' <				
RUN6					9' 40"	10' 15"	10' 30"	11' 10"

#### (実施例5)

実施例4で得たB3、C3、B4、C4およびB5、C5の各チューブについて15kgの雄犬の左右大腿静脈にカニューレシオンし、内側に乳酸リングルを5ml/hr流しながら、8hr放置し、その後、取り出してチューブの血栓の形成度を目視で観察した。その結果、B3、C3共にチューブの内外ともほとんど血栓は形成されなかったが、B4、C4、B5、C5では内側はほとんど閉塞し、外面にも血栓が多数付着しており、オゾン処理によるヘパリン固定化の効果は明らかであった。

IV人工肺へのヘパリンの固定および評価

#### (実施例6)

内径200μm、肉厚25μm、空孔率45%、平均孔径700Åのポリプロピレン性中空糸型人工肺(膜面積0.8m<sup>2</sup>)の中空糸にポリエーテル・ポリアミドブロックポリマーをコーティングした後、実施例1と同様のオゾン処理をし、さらにpH10に調整した0.5%PEI(ポリエチレンジアミン)に45℃、24時間浸漬した。

続いて実施例2により反応させた一部脱硫酸化ヘパリン0.5%、pH4.5酢酸緩衝溶液を作製し、この中空糸をこの溶液中に45℃、24時間浸漬した。続いて2.5%グルタルアルデヒド、pH4.5酢酸緩衝溶液中に、室温で24時間浸漬した。続いて1%NaBH<sub>4</sub>、pH10炭酸緩衝溶液中に、室温、4時間浸漬して人工肺Aを得た。

一方同様の人工肺について、血液入口からエタノールを流入させガス交換膜を親水化した後、蒸留水で置換した後、平均粒径が0.0125μmのコロイダルシリカ/水分散液を流入させガス交換膜に濾過させ、シリカを細孔に充填した。次に蒸留水を流入してガス交換膜内部に残留するシリカ/水分散液を十分排除した後、乾燥を行った。その後、人工肺Aと同様の処理を行なって人工肺Bを得た。

また、オゾン処理をしていない同様の人工肺を比較として人工肺Cとする。

#### (抗血栓性の評価実験)

人工肺A、BおよびCについて、25kgの雄犬にて大腿

動静脈A-Vシャントを行ない、max400ml/minで血液を循環させた。

その結果、人工肺A、Bとも8時間の循環中圧損の増加に伴う流量の低下は生じなかった。

人工肺Aは9時間より流量の低下が見られたが、人工肺Bでは12時間後も流量の低下は見られなかった。

これに対し、人工肺Cにおいては、人工肺中の血栓形成のため、2時間で循環は不能になった。

また、人工肺Aでは6hrより血漿の漏出が見られたが、人工肺Bでは12hr後も血漿の漏出は見られなかった。

B. カップリング剤として2以上のエポキシ化合物を用いた場合

#### (実施例7)

軟質塩化ビニルチューブ(テルモ社製NO.CBT650)に溶媒可溶性ポリウレタン(NKY-9LH/日本ポリウレタン)をコーティングした。このチューブをオゾン発生機にて、0.8l/minO<sub>2</sub>50℃の条件で10min処理した。このチューブに0.05%ポリエチレンジアミン(PEI)に45℃20hr浸漬し、続いて0.5%ヘパリン(pH4.0、0.1M酢酸Buffer)に45℃、4hr浸漬した。

これとは別にポリエポキシ化合物(デナコールEX-421(ナガセ化成社製))、ジエポキシ化合物(デナコールEX-313(ナガセ化成社製))をpH4.

0.10mM酢酸Bufferに溶かし、5%ポリエポキシ化合物、10%ジエポキシ化合物の水溶液を作り、続いて3000rpm、10minの遠心分離により水不溶分を沈殿させ、上清を分取し、上記処理チューブをそれぞれ浸漬し、各々をI、IIとする。なお、比較対照としてエポキシ化合物を含まないpH4.0、0.10mM酢酸Bufferを上記処理チューブに浸漬し、これをIIIとする。

これらを45℃で20hr、44hr反応させ各々をI-20(hr)、I-44(hr)、II-20(hr)、II-44(hr)とする。その後、pH10、1Mエタノールアミンに16hr浸漬させた後水洗した。これらのサンプルについてトリイジンブルー染色を行なったところ表3のようになった。

表 3

hr	本発明例Ⅰ	本発明例Ⅱ	比較例Ⅲ
20	+	+	-
44	≡	≡	-

## (実施例8)

溶媒可溶性ウレタン(NKY-9LH)のシートを、ディッピングにより作製した。このシートについて実施例7のように処理し、このシートにヘパリンを固定し、さらに実施例7と同じポリエポキシ化合物およびジエポキシ化合物を20hrあるいは44hr浸漬させ、エポキシ処理①をし、次いで1Mエタノールアミン処理②としてpH10、0、1Mエタノールアミン浸漬を16hrし、さらにpH10、1M塩化ナトリウムに浸漬し、イオン結合性のヘパリンの除去③を行なった。

これらについて、各操作時のシートをESCAにより、N、O、C、Sの元素組成比を測定した。結果を表4に示す。

表4 (S元素組成比%)

hr	本発明例Ⅰ		本発明例Ⅱ		比較例Ⅲ	
	20	44	20	44	20	44
①	1.91	2.07	2.03	1.96	2.03	2.03
②	0.99	1.12	0.92	1.24	0.57	0.51
③	0.93	1.17	0.94	1.28	0.60	0.53

## (実施例9)

表

\*

5

	そのまま評価				6%アルブミンインキュベーション後			
	RUN1	RUN2	RUN3	RUN4	RUN1	RUN2	RUN3	RUN4
I-44	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<
II-20	25°45"	32°20"	27°10"	40°55"	20°25"	23°15"	19°55"	30°45"
II-44	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<	60°<
Ⅲ	10°35"	12°05"	8°50"	7°20"	8°30"	9°15"	5°50"	13°30"

## (実施例10)

内径1.4mm、外径2mmの軟質塩化ビニールチューブの内外面に溶媒可溶性ポリウレタン(NKY-9LH)をコーティングし、実施例7と同様にI-44(hr) (比較対照IIIとしてエポキシ化合物0%-44hr処理)にしたがってヘパリン化チューブを作製した。これを15kgの雄犬の左右大腿動静脈にカニューレションし、内側を5ml/hrの乳酸リングルで流しながら、8hr放置し、その後取り出してチューブの血栓の形成度を目視で観察した。その結果、I-44はほとんど血栓はみられなかったが、III-44は内外とも血栓が多数み

\*内径1.4mmの軟質塩化ビニールチューブに溶媒可溶性ポリウレタン(NKY-9LH)を内面コートし、実施例7と同様に処理し、I-44(hr)、II-20(hr)、II-44(hr)の3種についてヘパリン化チューブを作製した。このチューブについてチャンドラルーブ法による抗血栓性評価を行なった。また比較対照としては実施例7のIIIを用いた。なおこれは、そのまま行なったもの、24hrを3回、6%アルブミンによりインキュベーションし、さらに余剰の吸着ヘパリンを徹底的に洗浄したものとについて行なった。その結果を表5に示す。

以上の結果よりエポキシ化合物にヘパリンを固定したことにより抗血栓性が付与された。またpH10、1Mエタノールアミン処理により余剰ヘパリンはほぼ除去されていると思われる。

40 られた。

## &lt;発明の効果&gt;

本発明においては、予め基材に所定の官能基を導入し、これらの基材およびヘパリンの官能基同士を直接、あるいは1つもしくは複数のカップリング剤を介して結合することにより、ヘパリンを基材に固定しているために、得られる医療用材料、またこれを用いた人工肺、心肺回路のような医療用器具における抗血栓性、基材に固定されたヘパリンの安定性が著しく改良され、血液灌流時にもヘパリンの流出のおそれが少なく、長時間の使用に耐えられるようになった。



【図面の簡単な説明】

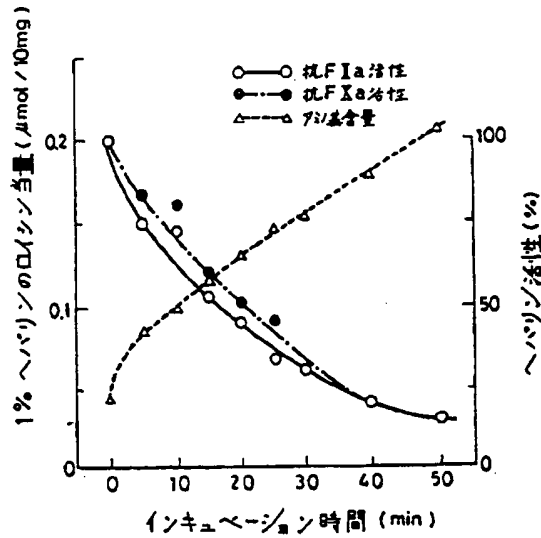
第1図はヘパリンのN-硫酸部位の脱硫酸化と活性の変化を示すグラフである。

第2図はヘパリンのN-硫酸部位の脱硫酸化による第1\*

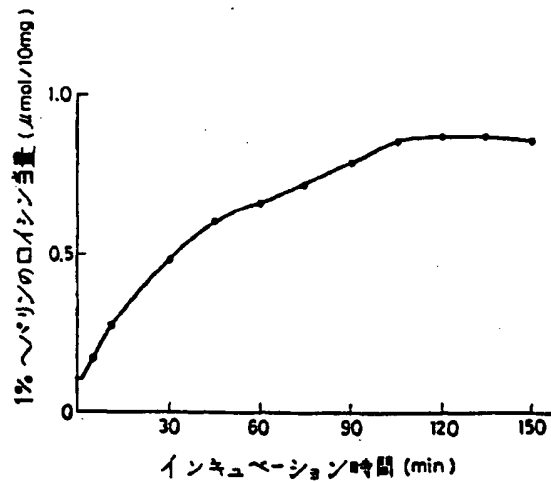
\* 級アミノ基量の変化を示すグラフである。

第3図は実施例4で得られた試料（医療用材料）の表面ヘパリン活性を示すグラフである。

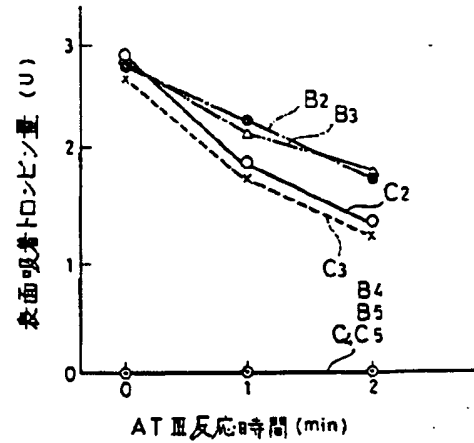
【第1図】



【第2図】



【第3図】



【公報種別】特許法（平成6年法律第116号による改正前。）第64条の規定による補正

【部門区分】第1部門第2区分

【発行日】平成10年（1998）6月25日

【公告番号】特公平6-38851

【公告日】平成6年（1994）5月25日

【年通号数】特許公報6-972

【出願番号】特願平1-173188

【特許番号】2129773

【国際特許分類第6版】

A61L 33/00 A

【手続補正書】

1 「特許請求の範囲」の項を「1 合成樹脂基材上にヘパリンが固定されてなる医療用材料であって、合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸化性官能基を導入し、この酸化性官能基を2つ以上のアミノ基を有するカップリング剤で処理してその表面にアミノ基を有する基材とし、このアミノ基に2つ以上のアルデヒド基を有するカップリング剤を介して、N-硫酸部位の一部が脱硫酸化されてヘパリンを共有結合させてなることを特徴とする医療用材料。

2 合成樹脂基材上にヘパリンが固定されてなる医療用材料であって、合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸化性官能基を導入し、この酸化性官能基を2つ以上のアミノ基を有するカップリング剤で処理してその表面にアミノ基を有する基材とし、このアミノ基とヘパリンの官能基とを反応させてヘパリンをイオン結合させ、次に2つ以上のエポキシ基を有するカップリング剤を架橋反応させ、さらにイオン結合性のヘパリンを除去して、ヘパリンを基材に共有結合させてなることを特徴とする医療用材料。

3 少なくとも血液と接触する部分が請求項1または2に記載の医療用材料から形成されてなる医療用器具。

4 (a) 合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸化性官能基を導入し、

(b) この酸化性官能基を2つ以上の第1級アミノ基を有するカップリング剤で処理して基材表面にアミノ基を導入し、

(c) このアミノ基に2つ以上のアルデヒド基を有するカップリング剤を介してN-硫酸部位の一部が脱硫酸化されたヘパリンを共有結合させることを特徴とする医療用材料の製法。

5 (a) 合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸

化性官能基を導入し、

(b) この酸化性官能基を2つ以上の第1級アミノ基を有するカップリング剤で処理して基材表面にアミノ基を導入し、

(c) このアミノ基とヘパリンの官能基とを反応させてヘパリンを基材にイオン結合させ、

(d) 次に、2つ以上のエポキシ基を有するカップリング剤を架橋反応させ、

(e) さらに、イオン結合性のヘパリンを除去して、ヘパリンを基材に共有結合させることを特徴とする医療用材料の製法。」と補正する。

2 第4欄1～2行「好ましい」の次に「すなわち本発明は、合成樹脂基材上にヘパリンが固定されてなる医療用材料であって、合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸化性官能基を導入し、この酸化性官能基を2つ以上のアミノ基を有するカップリング剤で処理してその表面にアミノ基を有する基材とし、このアミノ基に2つ以上のアルデヒド基を有するカップリング剤を介して、N-硫酸部位の一部が脱硫酸化されたヘパリンを共有結合させてなる医療用材料およびその製法を提供する。

さらに本発明は、合成樹脂基材上にヘパリンが固定されてなる医療用材料であって、合成樹脂基材をオゾン処理して基材上に酸化性官能基を導入し、この酸化性官能基を2つ以上のアミノ基を有するカップリング剤で処理してその表面にアミノ基を有する基材とし、このアミノ基とヘパリンの官能基とを反応させてヘパリンをイオン結合させ、次に2つ以上のエポキシ基を有するカップリング剤を架橋反応させ、さらにイオン結合性のヘパリンを除去して、ヘパリンを基材に共有結合させてなる医療用材料およびその製法を提供する。」を挿入する。